动 物 学 研 究 2003, Oct. 24 (5): 367～372 CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853
Zoological Research

广东省三市致倦库蚊种群的抗性水平、非特异性酯酶分布频率及遗传分化

张 柯[1]，叶镇清[1]，乔传令[1,3]，林立丰[2]，蔡松武[2]
（1. 中国科学院动物研究所 农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100080；
2. 广东省卫生防疫站，广东 广州 510000）

摘要：致卷库蚊（*Culex pipiens quinquefasciatus*）样本于2001年5月采自广州、佛山和中山。利用生物测定和淀粉凝胶电泳检测其对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性水平和抗性相关酯酶的分布频率。与北京敏感品系相比，3个种群对敌敌畏、对硫磷、仲丁威的抗性水平分别至少为21、8和5倍；以连锁形式存在的A8/B8和A9/B9是3种群主要的高活性酯酶，但A2/B2和B1有地区差异。由于种群间的基因流动，这些差异行将消失。

关键词：致倦库蚊；有机磷杀虫剂；酯酶；遗传分化
中图分类号：Q965.91；Q969.44 **文献标识码**：A **文章编号**：0254－5853(2003)05－0367－06

Resistant Level, Frequency of Non-specific Esterases and Genetic Differentiation in Mosquitoes *Culex pipiens quinquefasciatus* in Three Cities of Guangdong

ZHANG Ke[1], YE Zhen-qing[1], QIAO Chuan-ling[1,3], LIN Li-feng[2], CAI Song-wu[2]
(1. *State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects & Rodents, Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100080, *China*; 2. *Sanitation and Anti-Epidemic Station of Guangdong Province, Guangzhou* 510000, *China*)

Abstract: Samples of mosquitoes *Culex pipiens quinquefasciatus* were collected in Guangzhou, Foshan, Zhongshan in Guangdong Province in May 2001. Bioassay and starch gel electrophoresis were used to determine their resistant levels to organophosphates and BPMC, and the distribution frequency of resistant-related esterases in the 3 populations. The resistant level of the 3 populations to dichlorovos was higher than the sensitive strain of Beijing at least for 21 times, parathion for 9 times, and BPMC for 5 times. The associated A8/B8 and A9/B9 were the main highly active esterases in the 3 populations, but regional differences appeared in esterase A2/B2 and B1. It was supposed that the difference will disappeared due to gene flow.

Key words: *Culex pipiens quinquefasciatus*; Organophosphate insecticide; Esterase; Genetic differentiation

库蚊对有机磷杀虫剂的抗性具有抗性发展迅速等诸多特点，从而成为研究微进化的极好例子。它对有机磷杀虫剂、氨基甲酸酯类杀虫剂产生抗性的内在表现是非特异性酯酶活性升高，其分子机制是结构基因（*Est*-3和*Est*-2）扩增造成酯酶过量产生（Rooker et al, 1996）。如结构基因*Est*-2和*Est*-3共同扩增会引起酯酶A2/B2、A4/B4、A5/B5、A8/B8和A9/B9等过量产生；*Est*-2结构基因单独扩增又引起酯酶B1过量产生（Raymond et al, 1998）。

杀虫剂的广泛使用导致许多地区蚊虫自然种群产生不同程度的抗性（Raymond et al, 1991），广东省也不例外（Lin et al, 2000）。在广州地区抗性

收稿日期：2003－01－02；接受日期：2003－06－25
基金项目：国家自然科学基金资助项目（39980034）
3. 通讯作者（Corresponding author），Tel：86－10－62553369，E-mail：Qiaocl@panda.ioz.ac.cn

致倦库蚊中除了有世界范围广泛分布的抗性相关酯酶 B1 和 A2/B2（Qiao et al，1999），还有至今只在我国存在的抗性相关酯酶 A8/B8（Qiao et al，1999）和 A9/B9（Weill et al，2001）。致使该地区成为具有丰富抗性酯酶等位基因的地区之一，为研究抗性等位基因间的相互作用和进化过程提供了难得的场所。为此我们采用生物测定和淀粉凝胶电泳技术研究了广州、佛山和中山 3 个致倦库蚊种群的抗性水平、非特异性酯酶的分布和动态；结合种群遗传学理论，探讨基因流对致倦库蚊抗性酯酶分布的作用，为害虫的综合治理提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

2001 年 5 月，分别在广州、佛山和中山市郊野外收集致倦库蚊（*Culex pipiens quinquefasciatus*）的卵和幼虫；在实验室内饲养并连续传代。幼虫用于生物测定，成虫保存于 –70 ℃的低温冰箱。参考系为淡色库蚊（*Culex pipiens pallens*）北京敏感系，由军事医学科学院流行病研究所赵彤言博士提供。标准抗性系分别为 B1、A2/B2、A8/B8 的纯合蚊虫品系，即 TEM-R（Mouches et al，1987）、SELAX（Wirth et al，1990）和 MAO（Qiao et al，1999）。

1.2 生物测定方法

为了测定致倦库蚊野生种群对有机磷杀虫剂（敌敌畏和对硫磷）、氨基甲酸酯类农药（仲丁威）的抗性水平，根据其测定剂量范围的预备实验，配制 5 个不同浓度梯度的杀虫剂乙醇溶液；对北京敏感系也设定相应浓度的杀虫剂乙醇溶液，其结果作为对照（表 1）。

按照 Raymond et al（1987）的方法，3 市种群各组分别加入不同浓度的 1 mL 的杀虫剂溶液；对照种群各组则加入 1 mL 的无水乙醇，然后各加水 99 mL。每个浓度处理挑入四龄幼虫 20 头，重复 3 次，24 h 后记录幼虫死亡数。对照组死亡率大于 20%时重做，小于 20%时用 Abbott 公式校正死亡率。用 PROBIT 软件（Ratsira et al，1993）计算 LC_{50}值。

1.3 非特异性酯酶的淀粉电泳

采用 Tris-Malate-EDTA（TME）缓冲液体系进行淀粉电泳。从每个种群中随意选取多只成虫，用单个蚊虫的匀浆液上样，每次上样都加标准抗性系作为参考。测定苹果酸酶 ME（malic enzyme，E.C.1.1.1.40）、苹果酸脱氢酶 MDH（malate dehydrogenase，E.C.1.1.1.37）、甘油－3－磷酸脱氢酶 GPD（glycerol-3-phosphate dehydrogenase，E.C.1.1.1.8）、酯酶 EST（esterase，E.C.3.1.1.2）。电泳缓冲液、凝胶缓冲液及染色方案均参考 Pasteur et al（1988）的方法制作。

1.4 种群遗传学数据处理

根据 3 个酶系统 5 个位点的原始酶谱分析资料，按 FSTAT（version 2.9.3）（Goudet，2001）要求的格式编制输入文件，运行软件后获得各种群两两之间的 *Fst* 值（Weir & Cockerham，1984），用于衡量种群间的遗传分化程度。再根据 Wright（1931）提出的间接估计基因流的方法，计算基因流参数：$Nm \approx (1/Fst-1)/4$。其中 N 为有效种群大小，m 为种群间有效迁移率［当种群间的 $Nm>1$，表明基因流可以防止遗传漂变引起的种群分化

表 1 生物测定中所用杀虫剂的浓度梯度
Table 1 Concentration grade of insecticides used in bioassays

种群 Population	杀虫剂 Insecticide	浓度梯度 Concentration grade（1×10^{-6}mg/L）				
		1	2	3	4	5
广东三市种群 Study populations from 3 cities of Guangdong	敌敌畏 Dichlorovos	2 000	2 500	3 000	3 500	4 000
	对硫磷 Parathion	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
	仲丁威 BPMC	10	15	20	25	30
北京敏感品系（对照）Beijing-s[1]（control）	敌敌畏 Dichlorovos	60	80	100	120	140
	对硫磷 Parathion	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
	仲丁威 BPMC	0.8	2.4	4.0	6.0	8.0

[1] Sensitive strain.

(Slatkin, 1987)]；再计算种群间的遗传一致性（I）和遗传距离（D）系数。

2　结果与分析

2.1　致倦库蚊种群的抗性水平

3 个致倦库蚊种群抗性的生物测定结果见表 2。与北京敏感品系相比,3 个种群对有机磷杀虫剂的抗性水平较高:对敌敌畏的抗性比率达 20 倍以上;对硫磷次之,但也在 8 倍以上。而对氨基甲酸酯类杀虫剂仲丁威的抗性水平在 5 倍以上。推测与东南地区使用有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂的强度不同有关。

2.2　致倦库蚊种群过量产生的非特异性酯酶的分布频率

结合已知标准酯酶的电泳迁移情况，将不同酯酶类型区分开后，统计得出的不同酯酶的分布频率见表 3。广东地区 3 个种群的高活性酯酶主要为以连锁形式存在的 A8/B8 和 A9/B9（平均分布频率分别为 51.23%和 47.06%）。除了佛山种群中 A2/B2 的分布频率高于同一种群 A9/B9 的分布频率外，其他种群中 A2/B2 和 B1 的分布频率均小于同一种群中 A8/B8 和 A9/B9 的分布频率。

酯酶染色结果（图 1）表明，广州种群中 A8/B8 和 A9/B9 是主要的高活性酯酶，而 A8/B8 的活性强度明显高于 A9/B9；A2/B2 和 B1 的酯酶活性也较高；103 只蚊虫中只有 5 只酯酶活性较弱（见图 1：11 泳道）。除了 B1 外，酯酶 A 和 B 总是相伴，即酯酶 A 和 B 有连锁现象。以 A8/B8 和 A9/B9 杂合型出现的个体仅占所有检测蚊虫的 9.1%。

佛山种群酯酶活性与广州种群相似(图2),98

表 2　广东 3 个致倦库蚊种群对杀虫剂的抗性

Table 2　Resistance of 3 *Culex pipiens quinquefasciatus* populations[1] to insecticides

杀虫剂 Insecticide	种群 Population	LC_{50} (1×10^{-6}mg/L)	抗性比率 Ratio of resistance to Beijing-s	相关系数 r^2
敌敌畏 Dichlorovos	北京敏感系 Beijing-s	101.833	1.0	0.986
	广州 Guangzhou	2 980.306	29.267	0.940
	佛山 Foshan	2 919.486	28.669	0.983
	中山 Zhongshan	2 181.929	21.427	0.997
对硫磷 Parathion	北京敏感系 Beijing-s	0.345	1.0	0.983
	广州 Guangzhou	3.744	10.852	0.984
	佛山 Foshan	3.086	8.945	0.971
	中山 Zhongshan	4.004	11.606	0.975
仲丁威 BPMC	北京敏感系 Beijing-s	3.603	1.0	0.921
	广州 Guangzhou	18.734	5.200	0.953
	佛山 Foshan	24.237	6.727	0.969
	中山 Zhongshan	26.371	7.319	0.951

[1]四龄幼虫 Larvae at the fourth instar.

表 3　广东 3 个致倦库蚊种群中过量产生的非特异性酯酶的分布频率

Table 3　Frequency of over-produced non-specific esterases in 3 *Culex pipiens quinquefasciatus* populations

种群 Population	*n*	酯酶 Esterase (%)			
		B1	A2/B2	A8/B8	A9/B9
广州 Guangzhou	103	21.36	34.95	53.40	63.11
佛山 Foshan	98	25.51	40.82	46.94	30.61
中山 Zhongshan	88	4.45	0	53.4	47.47
平均 Mean	96	17.11	25.26	51.23	47.06

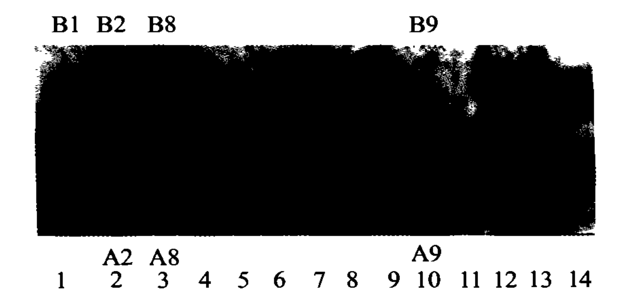


图 1 广州种群单只蚊虫酯酶的淀粉凝胶电泳

Fig.1 Starch gel electrophoresis of esterases from a mosquito (*Culex pipiens quinquefasciatus*) of Guangzhou population

只蚊虫中仅有6只酯酶活性较弱。该种群同样存在酯酶A和B的高度连锁现象，主要杂合型表现为A8/B8和A2/B2。

中山种群大部分个体显示较高的酯酶活性（图3)，仅有4只酯酶活性较弱。该种群中除了其他种群单独存在的B1外，还有单独存在的A8(图3：4、10泳道）和A9（图3：3、9泳道)，同时酯酶A和B的活性表现出一些差异。值得注意的是，在该种群中未检测到广泛存在于广州和佛山种群中的A2/B2，且B1的出现频率也远低于其他两种群。

2.3 3个致倦库蚊种群间的遗传分化

3个致倦库蚊种群两两间的 *Fst* 值与对应的基因流参数（*Nm*）列于表4，遗传一致性和遗传距离列于表5。

从表4可以看出广州和佛山种群间的基因流水平高达38，而中山与其他两种群要小得多，但均大于1。表5表明3种群间的遗传一致性相差不大，平均遗传距离为0.028，说明3地区致倦库蚊种群的遗传结构基本相同，未明显分化。

3 讨 论

3.1 致倦库蚊种群的酯酶分布和抗性动态

对广州、武汉、沙市致倦库蚊种群的研究显



图 2 佛山种群单只蚊虫酯酶的淀粉凝胶电泳

Fig.2 Starch gel electrophoresis of esterases from a mosquito (*Culex pipiens quinquefasciatus*) of Foshan population

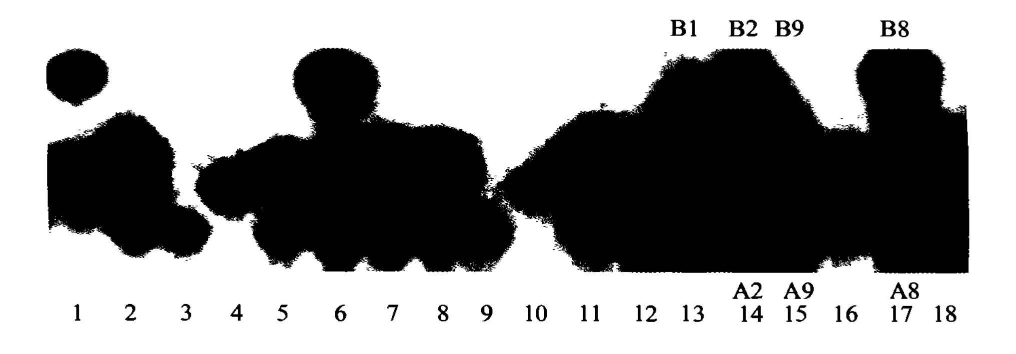


图 3 中山种群单只蚊虫酯酶的淀粉凝胶电泳

Fig.3 Starch gel electrophoresis of esterases from a mosquito (*Culex pipiens quinquefasciatus*) of Zhongshan population

表 4　3 个致倦库蚊种群间的 *Fst* 值（左下角）与 *Nm*（右上角）

Table 4　*Fst* (below diagonal) and *Nm* (above diagonal) among 3 populations of *Culex pipiens quinquefasciatus*

种群 Population	广州 Gaungzhou	佛山 Foshan	中山 Zhongshan
广州 Gaungzhou	—	38	3.08
佛山 Foshan	0.0066	—	2.23
中山 Zhongshan	0.075	0.101	—

表 5　3 个致倦库蚊种群间的遗传一致性（左下角）与遗传距离（右上角）

Table 5　Genetic identity (below diagonal) and genetic distance (above diagonal) among 3 populations of *Culex pipiens quinquefasciatus*

种群 Population	广州 Gaungzhou	佛山 Foshan	中山 Zhongshan
广州 Gaungzhou	—	0.003	0.035
佛山 Foshan	0.997	—	0.046
中山 Zhongshan	0.965	0.955	—

示，高活性酯酶 A8/B8 和 A9/B9 在 3 地都有分布，且广州的致倦库蚊种群中高活性的 A8/B8 和 A9/B9 的分布频率高于武汉和沙市，这两种高活性酯酶在国内外的其他地区还没有被发现（Sun & Qiao, 2000）。B1、A2/B2 在世界范围内的抗性库蚊种群中广泛分布（Raymond et al, 1991）。在北京地区的淡色库蚊种群中 B1 基因以 76%的频率出现，在昆明 A2/B2 基因以 52% 的频率存在（Liu & Qiao, 2001）。而 B1、A2/B2 并不是广东地区的主要酯酶形式，或许是抗性基因入侵的结果。

1995 年广州市致倦库蚊种群高活性酯酶 B1、A2/B2、A8/B8 和 A9/B9 的分布频率（Sun & Qiao, 2000）与 2002 年相比（表 6），B1、A2/B2、A9/B9 有不同程度增长，A8/B8 稍有下降。其中 A2/B2 的变化较显著（双尾检测，$|u| = 2.86$，$P < 0.05$），而 B1、A8/B8 和 A9/B9 的变化不显著（双尾检测，$|u|$ 分别为 1.45、0.56 和 0.85，$P > 0.05$）。推测这 7 年广州致倦库蚊种群抗性酯酶等位基因在选择压力下，既有外来抗性酯酶基因（A2/B2）的入侵，又存在酯酶基因间的相互作用，进而出现重组现象（Zhang et al, 2003）。

表 6　1995 和 2002 年致倦库蚊广州种群非特异性酯酶的分布频率

Table 6　Frequency of non-specific esterases in Guangzhou population of *Culex pipiens quinquefasciatus* in 1995 and 2002

时间 Time	代码 Code	*n*	酯酶 Esterases (%)			
			B1	A2/B2	A8/B8	A9/B9
1995	GZ/95	89	13	16	57	57
2002	GZ/02	103	21	34	53	63

3.2　种群遗传结构与酯酶基因的分布关系

广州、佛山、中山 3 个种群间遗传相似性较高、遗传距离较低；种群间每代迁移个体数很高，说明其遗传结构和微环境状况比较相似，频繁的基因交流阻止了种群分化。B1 和 A2/B2 在 3 种群中的分布有一定的差异，如在中山种群中就没有检测到 A2/B2。产生该现象的原因可能是 3 种群间的基因流水平存在差异，广州与佛山种群间的每代迁移个体数是广州与中山种群的 12 倍，是中山与佛山种群的 17 倍。随着时间的推移，种群间的基因交流或许会缩小这种差异。

致谢：特别感谢法国科学院科学与进化研究所 Raymond Michel 博士提供蚊虫标准参考系 TEM-R、SELAX 和 MAD。

参考文献：

Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3) [CP]. http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html.

Lin LF, Xu HZ, Zhang ZH, Liu LP, Cai SW, Lu WC, Feng LX, Zhuang DR, Deng P, Huang XD. 2000. Studies on insecticide resistance status and countermeasure of vectors of public health importance and its application in Guangdong Province [J]. *Chin. J. Vector. Bio. & Control.*, **11** (5): 340-344. [林立丰，徐火

周，张紫虹，刘礼平，蔡松武，卢文成，冯鎏祥，庄道荣，邓平，黄湘东. 2000. 广东省主要媒介害虫抗药性现状、对策研究及其应用. 中国媒介生物学及控制杂志，**11** (5): 340-344.]

Liu JE, Qiao CL. 2001. Molecular characterization of insecticide resistance in different populations of *Culex pipiens complex* [J]. *Acta Entomological Sinica*, **44** (3): 290-295. [刘俊娥，乔传令. 2001. 不同地区尖音库蚊复合组抗药性的分子特征. 昆虫学报，**44** (3): 290-295.]

Mouches C, Magnine M, Berge JB, Silvestri MD, Beyssat V, Pasteur N, Georghiou GP. 1987. Overproduction of detoxifying esterase in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their present in other insects [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**: 2113-2116.

Pasteur N, Pasteur G, Catalan J. 1988. Practical Isozyme Genetics [M]. England: Ellis Horwood Lond. 83-155.

Qiao CL, Sun ZQ, Liu JE. 1999. New esterase enzymes involved in organophosphate resistance in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Guang Zhou, China [J]. *J. Med. Entom.*, **36**: 666-670.

Ratsira D, Prato G, Raymond M. 1993. PROBIT, CRNS-U MII License L93019 [M]. Avenix: St. Georges d'Orques.

Raymond M, Pasteur N, Georghiou GP, Mellon RB, Wirth MC, Hawley MK. 1987. Detoxification esterases new to California, USA, in organophosphate-resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) [J]. *J. Med. Entomol.*, **24**: 24-27.

Raymond M, Callaghan A, Fort P, Pasteur N. 1991. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes [J]. *Nature*, **350**: 151-153.

Raymond M, Chevillon C, Guillemaud T, Lenormand T, Pasteur N. 1998. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens* [J]. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **353**: 1-5.

Rooker S, Guillemaud T, Berge'J, Pasteur N, Raymond M. 1996. Coamplification of esterase A and B genes as a single unit in *Culex pipiens mosquitoes* [J]. *Heredity*, **77**: 555-561.

Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations [J]. *Science*, **236**: 787-792.

Sun ZQ, Qiao CL. 2000. Characterizations of related esterase genes in *Culex pipiens quinquefasciatus* from different geographical regions [J]. *Acta Entomological Sinica*, **43** (suppl.): 20-25. [孙紫青，乔传令. 2000. 不同地区致倦库蚊种群相关酯酶基因的特征分析. 昆虫学报，**43** (增刊): 20-25.]

Weill M, Marquine M, Berthomieu A, Dubois MP, Bernard C, Qiao CL, Raymond M. 2001. Identification and characterization of novel organophosphate detoxifying esterase alleles in the guangzhou area of china [J]. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **17** (4): 238-244.

Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure [J]. *Evolution*, **38**: 1358-1370.

Wirth MC, Marquine M, Georghiou GP, Pasteur N. 1990. Esterases A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): Role in organophosphate resistance and linkage [J]. *J. Econ. Entomol.*, **27**: 202-206.

Wright S. 1931. Evolution in Mendelian population [J]. *Genetics*, **16**: 97-159.

Zhang K, Ye ZQ, Qiao CL. 2003. Recombination between two amplified esterase alleles observed in field *Culex pipiens populations* [J]. *Entomological Knowledge*, in press. [张 柯，叶镇清，乔传令. 2003. 库蚊野生种群扩增等位基因重组现象分析. 昆虫知识，待发表.]